

PCT/JP 03/15914

11.12.03

QNM/

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

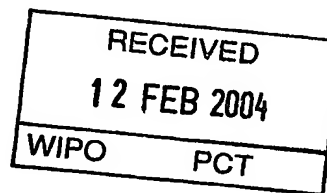
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月12日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-360094  
[ST. 10/C]: [JP2002-360094]

出 願 人  
Applicant(s): 国立循環器病センター総長

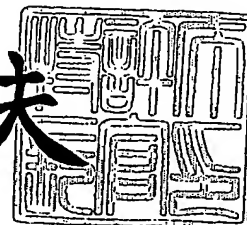


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3112698

【書類名】 特許願  
【整理番号】 DP-3314  
【提出日】 平成14年12月12日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内

【氏名】 藤里 俊哉

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内

【氏名】 岸田 晶夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内

【氏名】 船本 誠一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内

【氏名】 中谷 武嗣

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内

【氏名】 北村 惣一郎

【特許出願人】

【識別番号】 591108880

【氏名又は名称】 国立循環器病センター総長

【代理人】

【識別番号】 100060368

【弁理士】

【氏名又は名称】 赤岡 迪夫

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロ波照射による生体組織の処理方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、0℃～40℃の温度を維持しながらマイクロ波を照射することを特徴とする生体組織の処理方法。

【請求項 2】

前記処理は、生体組織から細胞成分を除去するための処理であり、処理液は水、高張液、低張液、界面活性剤溶液、酵素液、媒地、または少割合の有機溶媒を含んでいるこれらの液体である請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記処理は、生体組織を固定するための化学処理であり、処理液はグルタルアルデヒドを含む薬液である請求項 1 の方法。

【請求項 4】

前記マイクロ波照射は、周波数 2450 MHz において正味照射時間として 1 時間ないし 1 週間行われる請求項 1 ないし 3 のいずれかの方法。

【請求項 5】

処理される生体組織は、血管、心臓弁膜、心膜、角膜、羊膜、および硬膜を含む軟組織である請求項 1 ないし 4 のいずれかの方法。

【請求項 6】

処理される生体組織は、骨、軟骨、および歯を含む軟を含む硬組織である請求項 1 ないし 4 のいずれかの方法。

【請求項 7】

処理される生体組織は、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、および脳を含む臓器もしくはその一部である請求項 1 ないし 4 のいずれかの方法。

【請求項 8】

マイクロ波照射後、新鮮な洗浄液を用いて破壊されたドナー細胞を組織から洗浄除去する工程を含む請求項 2 の方法。

【請求項 9】

処理される生体組織は、ドナー細胞の除去を容易にする前処理を受けている請求項2の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

本発明は、再生医療、すなわち正常に機能しない患者自身の器官や組織に代って移植し、正常な機能を回復させる医療技術の分野に関する。詳しくは、動物由来の生体組織から細胞成分を取り去るか、または典型的にはグルタルアルデヒドである固定剤を用いて組織を固定することによって移植用組織片を作成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体組織をグルタルアルデヒドのような固定剤によって化学処理することによって、あるいは生体組織から細胞成分を取り去ることによって移植用組織片が作成され、広く臨床応用されている。例えば心臓弁置換術において、異種生体弁はブタ心臓弁あるいはウシ心膜を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。この異種生体弁は抗凝固性に優れてはいるが、若年者では5～10年程度の耐久性しかなく、通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。欧米では1985年頃から、我が国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。この同種弁は機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者では比較的早期に機能不全を来す症例も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されている。若年者に有効とされるRoss手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が少なくない。最近、これらの問題を解決するために、同種

弁からドナー由来細胞を除去することで抗原性の減弱によって免疫反応の関与を低下させることで、耐久性及び自己化を向上させる研究の報告がなされてきた。米国CryoLife社はSynerGraftと称する薬液処理による細胞除去方法を発表しており、移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している。また、ドイツ・ハノーバー医科大学のHaverichらのグループは、界面活性剤であるTriton X-100やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている。しかしながら、従来の界面活性剤あるいは薬液のみによる洗浄工程だけでは、組織片内部の細胞成分および細菌やウイルスの除去は薬液の表面からの拡散および浸透によるため、十分ではない。また、このような制約のため、大型の組織片の処理については完全な細胞除去や細菌、ウイルス除去が困難であった。また、化学処理による場合では、十分な効果を得るためには処理の度合いを高める必要があり、それによって埋入後の石灰化や処理試薬の除去などの問題が生じる。さらに、硬膜移植におけるBSE及びCJDの感染で明らかとなったように、移植組織の安全性確保は極めて重要であるが、現在の化学薬液処理においては、組織内のウイルスを完全に不活化できるとの保証が得られていない。また、処理過程における汚染によって、移植用組織からの感染事故もしばしば発生している。

#### 【0003】

また、細胞成分を取り去った異種または同種の移植用組織片は、これに患者自身の細胞を播種し、細胞片内で自家細胞を増殖させ、ハイブリッド再生組織として移植するためにも利用される。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記のような従来技術の問題点を改善することにある。すなわち、まず第1に、薬液処理では達成できない大型組織内部の細胞成分および細胞やウイルスの除去を達成すること、第2に、処理組織の生体力学特性を損なうことなく処理を行うこと、第3に、簡便かつ短時間に処理を行うことである。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、 $0^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度を維持しながらマイクロ波を照射することを特徴とする生体組織の処理方法を提供する。

#### 【0006】

本発明の方法は、生体組織から細胞成分を除去し、移植用組織片を作成する処理に適用することができる。この場合は、処理液として水、高張液、低張液、界面活性剤溶液、酵素液、媒地、または少割合の有機溶媒を含んでいるこれらの液体が使用される。

#### 【0007】

本発明の方法を組織を固定し、移植用組織片を作成する処理に適用する場合は、グルタルアルデヒドのような化学的固定剤の溶液を使用する。

#### 【0008】

いずれの処理においても、マイクロ波を照射しない従来の方法では、処理液は試料表面からの拡散および浸透によって全体に行きわたるので、長時間の処理が必要であり、この間に試料の汚染等の危険もあった。マイクロ波の照射は処理液が組織深部まで浸透に要する時間をこれまでの約10分の1に短縮することができるので、処理の効率を大幅に高めることができ、その間の試料の汚染等を防止することができる。また、組織から細胞を除去して移植片を作成する場合、これまでの方法では不可能ないし困難であった組織深部からの細胞核の除去を短時間で達成することが可能になる。

#### 【0009】

マイクロ波処理は病理組織学分野において、組織の固定、骨の脱灰、脱脂、免疫組織化学等に応用されている。しかしながら、マイクロ波照射を移植用組織片の作成に適用した事例はない。本発明の新しい生物由来組織の処理法においては、マイクロ波を透過するガラスあるいはプラスチック製の試料容器内に処理試料を入れ、細胞除去処理においては界面活性剤や低調液、高調液などの処理液を、細胞固定処理においてはグルタルアルデヒド等の化学固定液を、試料が完全に漬かるよう注ぐ。処理試料の温度を $0\sim 40^{\circ}\text{C}$ 内にコントロールしながらマイクロ波を照射するが、一般にマイクロ波を照射すると試料温度が上昇するため、長時

間マイクロ波を照射するには試料を冷却しなければならない。これには、例えば市販のマイクロウェーブ迅速試料処理装置の使用が有効である。この装置を、マイクロ波を照射するための電子レンジオーブン内の試料容器周囲に、電子レンジ外部の冷却装置によって冷却された不凍液を循環させるように改造して用いる。試料容器内に温度センサを設置し、冷却装置及びマイクロ波照射時間を間欠的に制御することで、マイクロ波照射時における試料温度を0～40℃にコントロールすることが可能である。病理組織学分野と異なり、移植用生体組織の場合は、生体力学特性を変化させないために、構成マトリックスの変性を防ぐ必要があり、マイクロ波照射時において温度が氷点以下や40℃以上になることを避けなければならない。

#### 【0010】

図1は、本発明を実施するための装置の一例を示す概略図である。装置は、マグネトロン12を備えた電子レンジオーブン1よりなる。オーブン内部には、冷却用不凍液21を収容した冷却槽2が設置されており、冷却槽2のほぼ中央に試料容器3が置かれる。試料容器3は処理液で満たされ、その中に試料すなわち処理しようとする生体組織4が浸漬される。冷却槽2および試料容器3はガラスやプラスチック例えばポリプロピレン、ポリスチレン等のマイクロ波を透過する材質でつくられる。先に述べたようにマイクロ波の照射は処理液31従って試料4を加熱し、試料の構成マトリックスを不可逆的に熱変性させるので、冷却槽2内の冷却液31をオーブン1の外に設置した冷却装置7と冷却槽2の間を導管5, 6を通して循環させる必要がある。そのため冷却槽21で暖められた冷却液21は導管6を通して冷却装置の熱交換器72へ返還され、再び冷却された後導管5を通して冷却槽21へポンプ71によって戻される。槽21内の冷却液の温度をセンサー11によって感知し、該温度が0℃～40℃の範囲内の一定温度例えば20℃に維持されるように、コントローラー13によってマグネトロン12の作動時間を間歇的かつ自動的に制御する。マイクロ波を均等に照射するために攪拌ファンその他の手段を設置することもできる。

#### 【0011】

本発明方法は、組織から細胞成分を除去するための既知の方法と組合せて使用



することもできる。例えば界面活性剤や酵素を使用して組織内の細胞を除去する前処理を行った後、組織片に残っている薬液を除去する洗浄をマイクロ波照射下に行うことができる。

### 【0012】

本発明方法の利用分野または用途は、

#### 1) 移植用動物由来軟組織

例：脳死あるいは心臓死ドナーからの移植用軟組織処理、もしくはブタ、ウシ等の異種動物からの移植用軟組織処理から細胞成分を除去する洗浄処理工程の効率を飛躍的に高めることができる。また、抗原性原因物質の大幅な減少が達成できる。

#### 2) 移植用動物由来硬組織

例：上記と同様に、骨・軟骨・歯などの硬組織処理を行うことができる。

#### 3) 医療用生物組織の処理

例：動物および植物由来組織のうち、細胞を含んだものについての細胞破壊処理に用いることができる。

### 【0013】

#### 実施例

1. 食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以内とした。肺動脈弁、血管を摘出し、ハンクス液で洗浄した。界面活性剤であるトリトンX-100の1%水溶液に試料を浸漬し、図1に概略図で示した装置にて20℃でマイクロ波を48時間間欠的に照射し、ドナー細胞を除去した。処理後、リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄除去した。処理標本の組織断面をHE染色により顕微鏡観察することで、組織学的に評価した。その結果、ブタ肺動脈弁葉組織では、図2に示すようにマイクロ波照射を併用すると、併用しない場合と比較してより組織深部まで細胞を除去することができた。
2. 同様に食用ブタ繁殖場から購入したブタ心臓弁を、界面活性剤であるトリトンX-100の1%水溶液中に24時間浸漬することで細胞除去した。その後、リン酸緩衝生理食塩水に浸漬し、10℃下にてマイクロ波処理を間欠的に48時間照射した。その結果、図3に示すように、マイクロ波を照射しない従来法では

細胞毒性を示すトリトン X-100 溶液を除去するために 3 週間程度必要であったのが、マイクロ波を照射することで数日間と大幅な処理時間の短縮が可能であった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明を実施するための装置の一例を示す概略図。

【図 2】 ブタ心臓弁組織の組織断面写真。左が従来法による処理、右がマイクロ波照射を併用した本発明による処理を示す。従来の処理では組織深部（写真の左下）内では細胞核の残存が認められる。

【図 3】 トリトン X-100 にて細胞除去したブタ心臓弁からのトリトン X-100 の除去効率を示すグラフ。マイクロ波照射による本発明方法では従来法の約 10 分の 1 の時間でトリトン X-100 を除去することが可能であった。

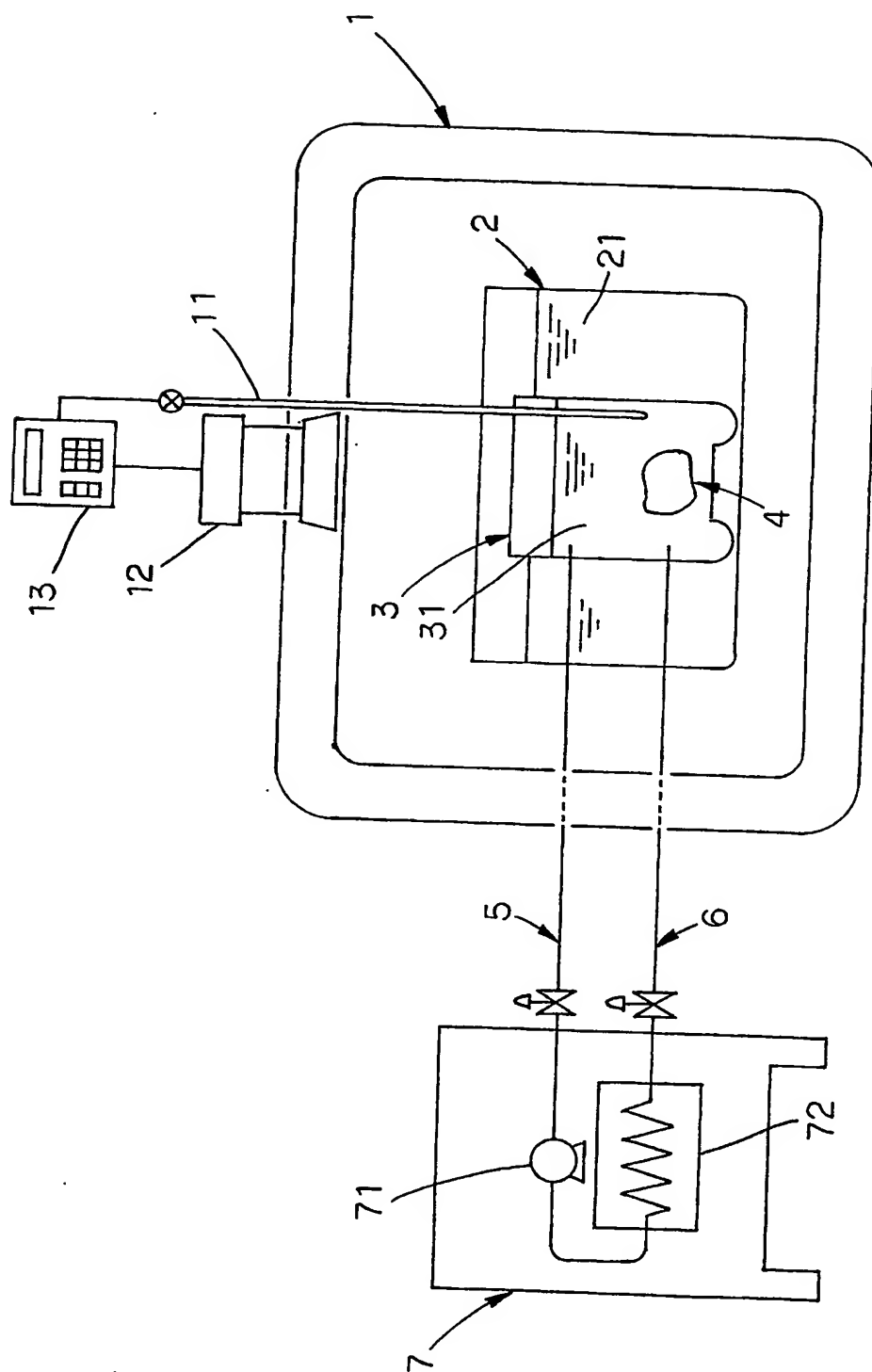
【符号の説明】

- 1・・・電子レンジオーブン
- 2・・・冷却槽
- 3・・・試料容器
- 4・・・試料
- 5, 6・・・冷却液循環導管
- 7・・・冷却装置
- 11・・・温度センサー
- 12・・・マグネトロン
- 13・・・コントローラー

【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】

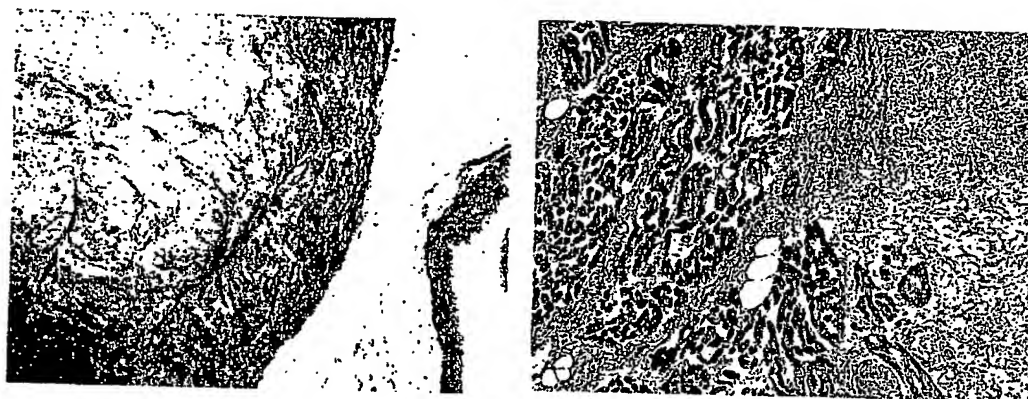
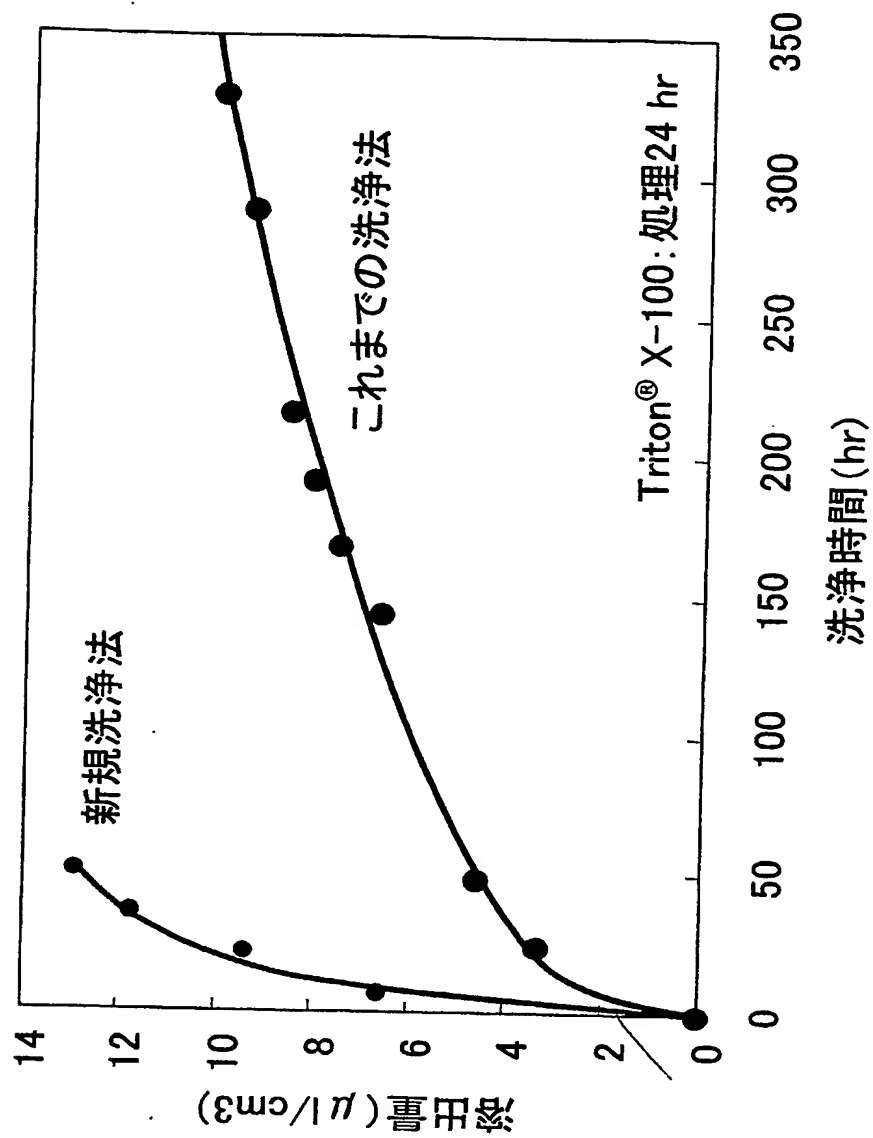


図 1. ブタ心臓弁組織の組織断面写真。左が従来処理、右がマイクロ波照射を併用した処理。従来处理では組織深部（左下）内では細胞核の残存が認められる。

【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 動物由来の生体組織からドナー細胞を除去または固定化する処理を効果的に達成する方法を提供する。

【解決手段】 処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $40^{\circ}\text{C}$ の温度を維持しながらマイクロ波を照射することを特徴とする生体組織の処理方法。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 6 0 0 9 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 1 0 8 8 8 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 5 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号

氏 名

国立循環器病センター総長